

Dinamika formiranja mikrotubula

Topić, Magda

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:167976>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Magda Topić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Dinamika formiranja mikrotubula

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. lipnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

8. rujna 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Citoskelet, stanični ciklus i dinamika mikrotubula.....	1
<i>1.1.1. Citoskelet.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. Stanični ciklus</i>	<i>2</i>
<i>1.1.3. Mitoza</i>	<i>5</i>
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	8
2.1. Tubulin i dinamika formiranja mikrotubula	8
<i>2.1.1. Tubulin i građa mikrotubula</i>	<i>8</i>
<i>2.1.2. Dinamika mikrotubula</i>	<i>10</i>
2.2. Diobeno vreteno i dinamika mikrotubula.....	13
<i>2.2.1. Struktura i organizacija diobenog vretena</i>	<i>13</i>
<i>2.2.2. Proteini diobenog vretena.....</i>	<i>15</i>
<i>2.2.3. Mehanizmi kretanja kromosoma</i>	<i>18</i>
2.3. Zaključak.....	19
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXI

§ Sažetak

Mikrotubuli, cjevaste strukture koje se sastoje od proteina tubulina, dio su staničnog kostura, odnosno citoskeleta. Mikrotubuli se neprestano sastavljaju i rastavljaju, što je fenomen poznat kao dinamička nestabilnost. Mikrotubuli su izrazito važni u brojnim staničnim procesima, posebice u staničnoj diobi, ali su također važni i za organizaciju stanice u interfazi. Dinamika formiranja mikrotubula doprinosi unutarstaničnom transportu organela i vezikula i održavanju oblika stanice. Jedan od ključnih događaja u staničnoj diobi je formiranje bipolarnog vretena, složene strukture sastavljene od mikrotubula koja omogućuje odvajanje kromosoma tijekom mitoze u stanice kćeri. Razumijevanje dinamike formiranja mikrotubula temeljno je za razotkrivanje mehanizama koji leže u osnovi sklapanja i funkcije vretena. U ovom je radu dan kratki pregled procesa staničnog ciklusa te funkcije mikrotubula u pojedinim procesima. Poseban je fokus stavljen na mitozu zbog izrazito važne uloge mikrotubula u procesu diobe stanica. Dodatno su istaknuti procesi uključeni u nukleaciju, polimerizaciju i organizaciju mikrotubula tijekom formiranja diobenog vretena, kao i regulatorni čimbenici koji upravljaju dinamikom mikrotubula. Opisani su proteini povezani s mikrotubulima te je naglašen njihov doprinos funkcioniranju diobenog vretena. Na kraju rada dan je kratak pregled organizacije diobenog vretena i mehanizama kretanja kromosoma zbog toga što dinamika mikrotubula ima značajnu ulogu u tom procesu. Uvid u dinamičku prirodu mikrotubula i njihovu regulaciju ključni su za razumijevanje normalnih staničnih procesa, ali i grešaka, posebice mitotičkih, koje mogu pridonijeti različitim bolesnim stanjima. Regulacija dinamike mikrotubula ključna je za pravilno funkcioniranje stanica, a greške u regulaciji ovog procesa mogu imati značajne implikacije na staničnu homeostazu i ljudsko zdravlje.

§ 1. UVOD

1.1. Citoskelet, stanični ciklus i dinamika mikrotubula

1.1.1. Citoskelet

Citoskelet je složena i dinamična mreža proteina unutar stanica koja stanicama pruža strukturnu potporu, olakšava unutarstanični transport organela i vezikula te posreduje u staničnoj pokretljivosti. Citoskelet na taj način doprinosi ukupnoj organizaciji i funkciji stanica, a sastavljen je od tri glavne komponente - mikrofilamenata, intermedijarnih filamenata i mikrotubula.¹

Mikrofilamenti, drugog naziva aktinski filamenti, najtanje su komponente citoskeleta te imaju promjer od otprilike 7 nm. Sastoje se od polimeriziranih aktinskih podjedinica. Radi se o izrazito dinamičnim strukturama koje se konstantno sastavljaju i rastavljaju. Aktinski filamenti izrazito su važni za određivanje oblika stanice, pokretljivost stanice te intracelularni transport. Također, uključeni su i u procese citokineze, endocitoze i adhezije stanica.²

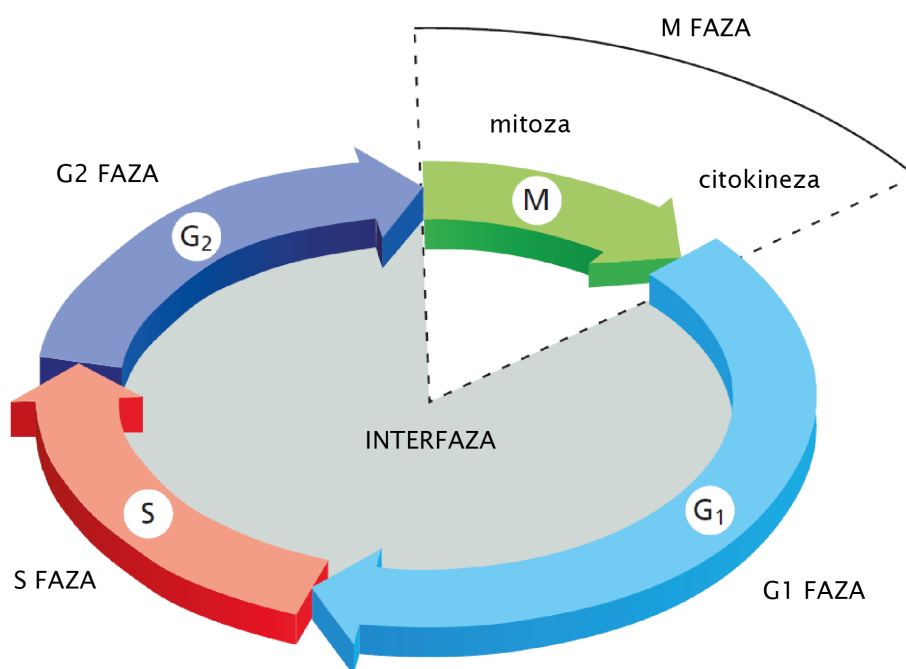
Intermedijarni filamenti osiguravaju strukturnu potporu stanicama. Promjera su otprilike 10 nm i sastoje se od raznovrsnih proteina poput keratina, vimentina i lamina. Za razliku od ostalih komponenti citoskeleta, intermedijarni filamenti nisu dinamički i relativno su stabilni. Doprinosu strukturi jezgre, integritetu stanice i specifičnim funkcijama pojedinih stanica koje tvore tkiva. Uz to su izrazito važni za održavanje samog oblika stanice, odolijevanje stanica mehaničkom stresu te za međusobnu adheziju stanica.²

Mikrotubuli, najveće komponente citoskeleta, sačinjeni su od šupljih cilindričnih struktura koje čine heterodimeri α - i β -tubulina.³ Mikrotubuli sudjeluju u brojnim procesima koji su nužni za stanice poput intracelularnog transporta i diobe stanica te su uz to važni i za pokretljivost stanica. Proteini vezani za mikrotubule (MAPs, eng. *microtubule associated proteins*) reguliraju dinamiku proteina, njihovo sastavljanje te organizaciju u prostoru.^{4,5}

Dinamika citoskeleta strogo je regulirana kako bi se osigurala odgovarajuća funkcija pojedine stanice. Brojni regulatorni mehanizmi koji uključuju raznovrsne signalne putove, molekularne motore i post-translacijske modifikacije na različite načine kontroliraju organizaciju citoskeleta.⁵

1.1.2. Stanični ciklus

Stanični ciklus eukariotskih stanica strogo je reguliran proces koji osigurava rast stanica kao i točnu replikaciju genetičkog materijala te diobu stanica. Sastoji se od nekoliko različitih faza, a svaku karakteriziraju specifični događaji i kontrolne točke koje upravljaju napredovanjem u sljedeću fazu.² Mikrotubuli igraju ključnu ulogu u višestrukim aspektima staničnog ciklusa, uključujući replikaciju DNA, segregaciju kromosoma i citokinezu.^{6,7} Faze staničnog ciklusa su interfaza, koju čine G1, G2 (eng. *gap*) i S faza (eng. *synthesis*) te mitoza koja se često naziva i M fazom (eng. *mitosis*).² U interfazi dolazi do replikacije DNA te se stanica priprema za staničnu diobu. Raspored faza staničnog ciklusa, kao i približni omjer trajanja svake od njih, prikazan je na slici 1.

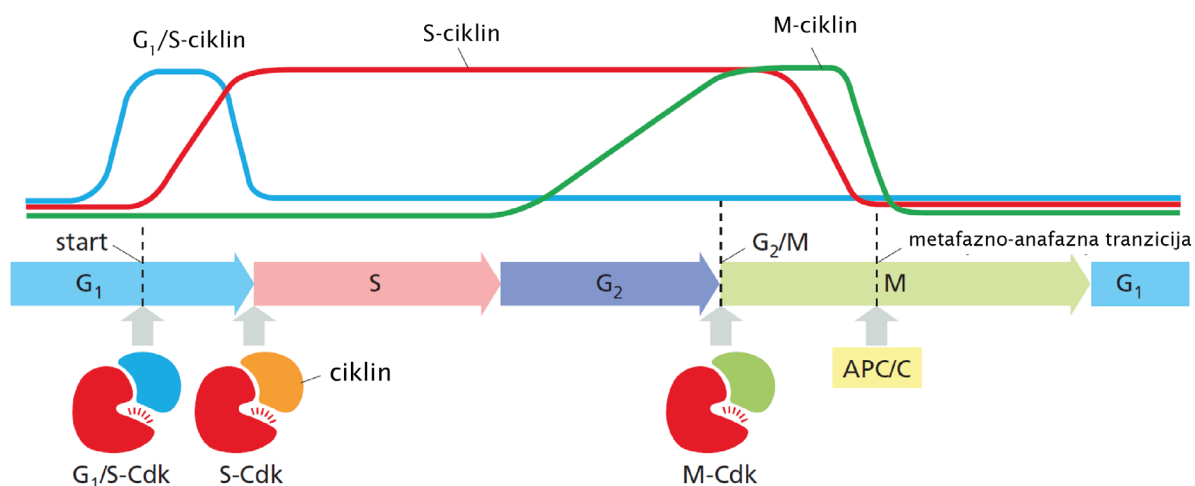


Slika 1. Grafički prikaz staničnog ciklusa i faza koje čine stanični ciklus. Preuzeto i prilagođeno prema referenci 2.

G1 faza početna je faza interfaze koja prethodi sintezi DNA. Ima presudnu ulogu u pripremi stanice za replikaciju DNA i napredovanje u sljedeće faze staničnog ciklusa. Osim svoje uloge u napredovanju staničnog ciklusa, G1 faza također doprinosi formiranju i organizaciji mikrotubula, čime utječe na različite stanične procese. G1 fazu karakterizira rast stanica, aktivna sinteza proteina i praćenje vanjskih signala kako bi se osiguralo da su uvjeti za napredovanje staničnog ciklusa povoljni. Trajanje G1 faze može značajno varirati među različitim tipovima stanica i ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući veličinu stanice, faktore

rasta i regulatorne proteine staničnog ciklusa. U kasnoj G1 fazi stanica prolazi kroz prvu kontrolnu točku staničnog ciklusa koja se kod kvasaca naziva START, dok se kod sisavaca naziva restrikcijom točkom. Stanica prolazi kroz navedenu kontrolnu točku te je dopuštena replikacija DNA u sljedećoj fazi staničnog ciklusa ako su izvanstanični uvjeti povoljni.² Dok se formiranje i organizacija mikrotubula obično povezuju sa sljedećim fazama staničnog ciklusa, neki dokazi upućuju na njihovu uključenost u procese G1 faze. Tijekom G1 faze, mikrotubuli prolaze kroz reorganizaciju i tvore radijalnu strukturu oko jezgre. Ova mreža radijalnih mikrotubula pruža stanici strukturnu potporu i stabilnost te je uključena u procese unutarstaničnog transporta.^{8,9} Centrosomi služe kao glavni centri za organiziranje mikrotubula (MTOC, eng. *microtubule organising centres*) u životinjskim stanicama i igraju ključnu ulogu u nukleaciji i formaciji mikrotubula.^{2,10} Osim toga, mikrotubuli doprinose napredovanju G1 faze tako da interagiraju s regulatornim proteinima staničnog ciklusa. Poremećaj organizacije mikrotubula u G1 fazi može dovesti do defekata u napredovanju staničnog ciklusa i stanične diobe.¹¹

S faza slijedi nakon G1 faze i prethodi G2 fazi. Posvećena je sintezi DNA, tijekom koje se genetski materijal duplicira kako bi se osiguralo da svaka stanica kćer dobije identičnu kopiju. Replikacija DNA složen je proces koji uključuje više proteina, enzima i regulatornih čimbenika. Napredovanje kroz S fazu je strogo regulirano kako bi se osigurala točna i potpuna replikacija genoma. Ključni regulatorni proteini, kao što su ciklini i kinaze ovisne o ciklinu (CDK, eng. *cyclin dependent kinases*), upravljaju urednim napredovanjem kroz stanični ciklus. Razine ciklina fluktuiraju tijekom staničnog ciklusa kao što je vidljivo na slici 2, a CDK su enzimi koji postaju aktivni kada se vežu za svoje odgovarajuće cikline.² Prema slici 2, u svakoj od faza staničnog ciklusa ključni su odgovarajući ciklini koji su dobili naziv prema fazi u kojoj su aktivni – G1/S-ciklini, S-ciklini i M-ciklini. Tijekom staničnog ciklusa mijenjaju se koncentracije pojedinih ciklina, dok koncentracija CDK ostaje konstantna. Prilikom replikacije DNA postaje aktivan kompleks S-ciklina i kinaza ovisnih o ciklinu, dok je u mitozu aktivan kompleks M-ciklina i CDK. Prijelaz iz metafaze u anafazu koji je opisan kasnije u tekstu pokreće kompleks APC/C.



Slika 2. Variranje koncentracija kompleksa ciklin-CDK tijekom staničnog ciklusa. Preuzeto i prilagođeno prema referenci 2.

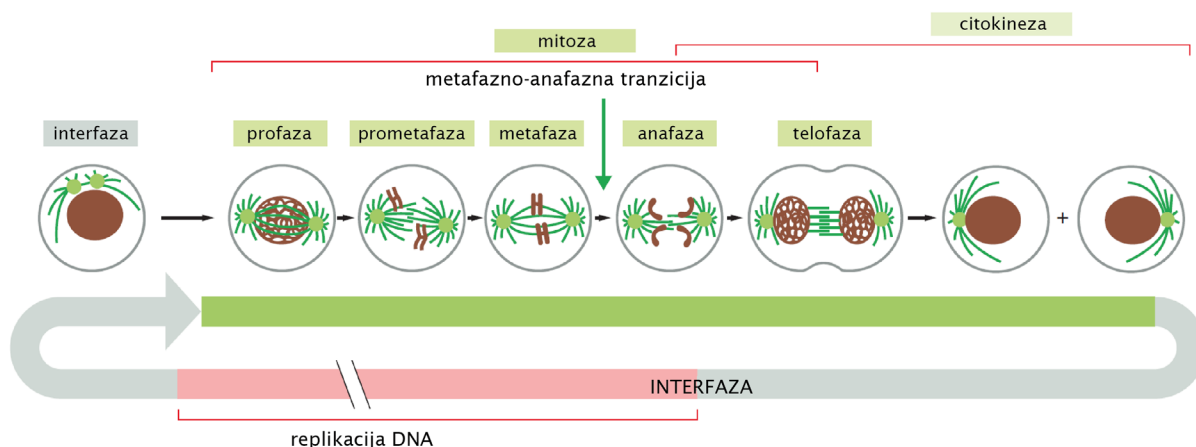
Mikrotubuli se uglavnom ne povezuju sa S fazom, koja je prvenstveno usmjerena na replikaciju DNA. Međutim, nedavna istraživanja pokazuju da mikrotubuli igraju bitnu ulogu u koordinaciji replikacije DNA i olakšavanju pravilnog napredovanja kroz S fazu. Tijekom S faze, mikrotubuli su uključeni u koordinaciju i regulaciju duplikacije centrosoma, koja je usko povezana s replikacijom DNA. Duplikacija centrosoma događa se usklađeno s replikacijom DNA kako bi se osiguralo da svaka stanica kćer naslijedi kompletan skup centrosoma. Mikrotubuli koji potječu iz centrosoma ključni su za uspostavljanje bipolarnih vretena tijekom mitoze, olakšavajući pravilnu segregaciju kromosoma.¹⁰ Nadalje, istraživanja pokazuju da mikrotubuli izravno stupaju u interakciju s ključnim proteinima koji sudjeluju u replikaciji DNA i napredovanju S faze te da mikrotubuli doprinose detekciji grešaka u replikaciji DNA pri čemu stanica ne može proći kroz odgovarajuće kontrolne točke ako se primijeti pogreška.^{12,13}

G2 faza slijedi S fazu i prethodi staničnoj diobi u M fazi. G2 je faza u kojoj se stanice podvrgavaju daljnjoj pripremi za staničnu diobu. Osim svoje uloge u napredovanju staničnog ciklusa, G2 faza također igra značajnu ulogu u formiranju i organizaciji mikrotubula. U G2 fazi stanice osiguravaju da je replikacija DNA dovršena točno i bez grešaka. Na kraju G2 faze, stanica prolazi kroz G2/M kontrolnu točku prikazanu na slici 2 koja ne dopušta stanici da uđe u mitozu dok se genom potpuno i samo jednom ne udvostruči. Tako G2 faza služi kao vrijeme za stanice da procijene oštećenje DNA, poprave sve pogreške replikacije i pripreme se za mitozu.² Ispravno napredovanje kroz G2 fazu ključno je za osiguranje vjerne segregacije kromosoma i stanične diobe. Kao što je prethodno spomenuto, važnu ulogu u regulaciji

staničnog ciklusa imaju ciklini i kinaze ovisne o ciklinu. U G2 fazi, ciklin B se kombinira s CDK1 kako bi formirao aktivni kompleks MPF (eng. *maturation-promoting factor*), koji igra ključnu ulogu u pokretanju mitoze. Aktivacija MPF-a pokreće razne događaje potrebne za ulazak u mitozu.^{14,15} Tijekom G2 faze, mikrotubuli prolaze kroz značajnu reorganizaciju i igraju ključnu ulogu u pripremi za formiranje diobenog vretena i segregacije kromosoma u narednoj M fazi. Također, pokazano je da su mikrotubuli u G2 fazi uključeni u regulaciju G2/M kontrolne točke staničnog ciklusa. Mikrotubuli mogu prenositi signale do regulatornog mehanizma staničnog ciklusa, pridonoseći pravilnom napredovanju kroz G2 fazu i kasnijem ulasku u mitozu.^{16,17}

1.1.3. Mitoza

Mitoza je naziv za proces stanične diobe koji osigurava točnu distribuciju genetskog materijala od roditeljske stanice do dviju stanica kćeri. Iako je jedna od faza staničnog ciklusa, i mitozu uključuje niz različitih faza, gdje svaku čine specifični događaji i regulatorni mehanizmi.² Shema mitoze i faza koje čine mitozu prikazana je na slici 3.



Slika 3. Grafički prikaz ključnih događaja stanične diobe. Preuzeto i prilagođeno prema referenci 2.

Profaza je prva faza mitoze i označava njezin početak. Radi se o dinamičnom procesu kojeg karakterizira značajna reorganizacija staničnih komponenti. Tijekom profaze događa se nekoliko ključnih događaja za mitozu: formiranje kromosoma, raspad jezgrine ovojnice (NEBD, eng. *nuclear envelope breakdown*) i odvajanje centrosoma.² Na početku profaze dolazi do kondenzacije kromatina pri čemu se formiraju kromosomi. Kondenzacija kromatina je olakšana vezanjem različitih proteina na DNA, što rezultira nastajanjem zbijenih struktura – kromosoma. Jezgrina ovojnica, koja odvaja jezgru od citoplazme, raspada se tijekom profaze.

Taj proces omogućuje interakciju mikrotubula s kondenziranim kromosomima, a olakšava ga fosforilacija proteina jezgrine ovojnice. Zatim se centrosomi, koji su se duplicirali tijekom S faze staničnog ciklusa, vođeni motornim proteinima pomiču na suprotne polove stanice. Kako se centrosomi odvajaju, dolazi do nukleacije mikrotubula iz svakog od njih te tako nastaje bipolarno diobeno vreteno. Mikrotubuli nukleiraju iz svakog centrosoma, šireći se prema središtu stanice i stupajući u interakciju s kondenziranim kromosomima.^{18,19}

Prometafaza je prijelazna faza koja premošćuje profazu i metafazu. U prometafazi dolazi do završetka raspada jezgrine ovojnice, što dovodi do raspršivanja komponenti jezgrine ovojnice u citoplazmu.² Kako se jezgrina ovojnica rastavlja, mikrotubuli koji izlaze iz polova vretena šire se prema kondenziranim kromosomima. Mikrotubuli zatim stupaju u interakciju s proteinskim kompleksima zvanim kinetohore, koji se okupljaju na centromernim regijama kromosoma. Pričvršćivanje mikrotubula na kinetohore ključno je za poravnavanje kromosoma na metafaznoj ploči u sljedećoj fazi mitoze. Kinetohorni mikrotubuli brojnim silama djeluju na kromosome, usmjeravajući njihovo kretanje i poravnavanje. Ti su mikrotubuli dinamički izrazito nestabilni, kontinuirano rastu i smanjuju se, dok traže pravilno pričvršćivanje za kinetohore.^{20,21}

Metafaza je faza mitoze koju karakterizira poravnavanje kromosoma na metafaznoj ploči, ravnini koja se nalazi u središtu diobenog vretena, tj. u središtu stanice u mitozu. Ovo usklađivanje je ključno za jednaku distribuciju genetskog materijala stanicama kćerima tijekom sljedećih faza mitoze.^{2,20} Pravilno formiranje i organizacija mikrotubula ključni su za održavanje integriteta diobenog vretena i olakšavanje proravnjanja kromosoma u ekvatorijalnu ravninu vretena. Sile koje djeluju na mikrotubule pričvršćene na kinetohore doprinose pravilnom položaju i rasporedu kromosoma. Stanica u metafazi prolazi kontrolnu točku diobenog vretena, odnosno SAC (eng. *spindle assembly checkpoint*), koja je kontrolna točka prijelaza iz metafaze u anafazu.²² Kontrolna točka metafazno-anafazne tranzicije osigurava da su svi kromosomi ispravno pričvršćeni na mikrotubule i poravnati u metafaznoj ploči prije početka anafaze. To radi tako da provjerava napetost na kinetohorima i odgađa anafazu dok se svi kromosomi pravilno ne poravnaju.^{23,24} APC/C (eng. *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) veliki je proteinski kompleks koji djeluje kao E3-ubikvitin-ligaza, što znači da cilja specifične proteine za razgradnju pomoću proteasoma. Glavna funkcija APC/C-a je osigurati pravilno napredovanje staničnog ciklusa. Jedna od najvažnijih uloga APC/C-a je tijekom prijelaza iz metafaze u anafazu tijekom mitoze. Usmjeren je na proteine koji se trebaju

razgraditi kako bi se sestrinske kromatide odvojile i pomaknule prema suprotnim polovima stanice. Poticanjem razgradnje proteina poput sekurina i ciklina B, APC/C omogućuje aktivaciju separaze kako bi se pokrenula anafaza.^{2,25,26}

Anafaza je faza mitoze koju karakterizira odvajanje sestrinskih kromatida i njihovo kretanje prema suprotnim polovima stanice. Tijekom anafaze cijepaju se veze koje drže sestrinske kromatide zajedno, poznate kao kohezini te tako dopuštaju kromatidama da se odvoje. Kako anafaza napreduje, odvojene kromatide pomiču se prema suprotnim polovima vretena. Ovo kretanje pokreće depolimerizacija mikrotubula u blizini kinetohora i aktivnost motornih proteina.² Mikrotubuli kontinuirano depolimeriziraju na svojim krajevima kinetohora, povlačeći kromosome prema polovima. Navedeno odvajanje olakšano je djelovanjem motornih proteina kao što su dinein i kinezin, koji se kreću duž mikrotubula i pridonose silama povlačenja kromosoma. Tijekom anafaze također dolazi do izduživanja vretena kako se dva skupa odvojenih kromosoma razmiču. Ovo produljenje je potaknuto klizanjem preklapajućih mikrotubula u interpolarnoj regiji i kontinuiranom polimerizacijom mikrotubula iz polova vretena. Dinamičko ponašanje mikrotubula, uključujući njihovu polimerizaciju i depolimerizaciju, omogućuje produljenje i održavanje strukture vretena.^{7,27}

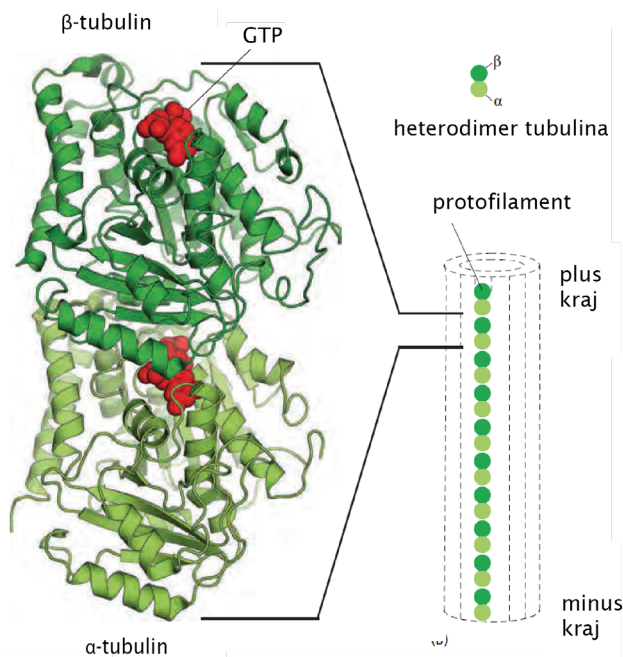
Telofaza je završna faza mitoze koju karakterizira potpuno odvajanje kromosoma koji se nalaze na suprotnim polovima stanice.² Dva skupa odvojenih kromosoma počinju se dekonenzirati, prelazeći iz svog visoko kondenziranog stanja u stanje raspršenijeg kromatina. Kako se kromosomi dekonenziraju, jezgrina ovojnica počinje se reformirati oko svakog skupa kromosoma na suprotnim polovima. Ovaj proces uključuje sastavljanje kompleksa nuklearnih pora i regrutiranje komponenti nuklearne membrane. Mikrotubuli osiguravaju strukturni okvir koji omogućuje ponovno formiranje jezgrine ovojnice.²⁸ Telofaza je često usko povezana s inicijacijom citokineze, fizičkim odvajanjem stanica koje nastaju tijekom mitoze. Tijekom tog procesa, kontraktilni prsten sastavljen od aktinskih i miozinskih filamenata formira se na ekvatoru stanice i sužava, što dovodi do diobe citoplazme i konačnog nastajanja dviju zasebnih stanica kćeri.^{29,30}

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Tubulin i dinamika formiranja mikrotubula

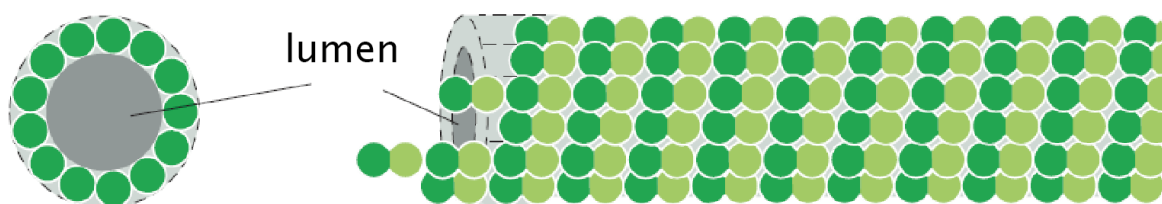
2.1.1. Tubulin i građa mikrotubula

Kao što je prethodno u tekstu spomenuto, mikrotubuli su polimeri proteina tubulina. Tubulin je zapravo heterodimer α -tubulina i β -tubulina. Podjedinice α -tubulina i β -tubulina imaju slične ukupne strukture prikazane na slici 4. Iako se radi o različitim strukturama, one dijele gotovo pola slijeda aminokiselina. Svaka podjedinica sastoji se od globularne domene, koja se naziva tubulinski monomer, i nestrukturiranog C-terminalnog repa. Globularna domena i α -tubulina i β -tubulina sadrži vezno mjesto za GTP (gvanozin-trifosfat), koje igra ključnu ulogu u dinamici mikrotubula. U slučaju α -tubulina, kad se GTP veže za vezno mjesto, koje se još naziva i N vezno mjesto, ne dolazi do hidrolize ni izmjene GTP-a pa se zbog toga GTP može smatrati integralnim dijelom strukture α -tubulina. Kod β -tubulina dolazi do vezanja tubulina za E vezno mjesto i hidrolize GTP-a u GDP (gvanozin-difosfat) te također može doći do izmjene nukleotida vezanih na β -tubulinu i onih u otopini.^{2,31} Struktura α -tubulina i β -tubulina gotovo su identične jer se oba monomera sastoje od jezgre koju čine dvije β -ploče koje okružuju α -zavojnice. Kod pojedinog se monomera mogu izdvojiti tri glavna dijela: amino-terminalna domena gdje se nalazi vezno mjesto za nukleotid, C-terminalna domena gdje bi se mogli vezati motorni proteini i intermedijarna domena. Nukleotid koji se veže na N-terminalnoj domeni također može interagirati i s intermedijarnom domenom. Zanimljivo je da se u intermedijarnoj domeni nalazi vezno mjesto za Taxol® – antitumorski lijek koji je poznat kao prva tvar koja stabilizira mikrotubule koja je opisana u literaturi.^{31,32} Kao što je vidljivo na slici 4, protofilamenti mikrotubula nastaju tako da se naizmjenično slažu, tj. uzdužno polimeriziraju α - i β -tubulin. Krajevi protofilamenata razlikuju se, onaj kraj na kojem se nalazi se α -tubulin naziva se (-) kraj, dok je kraj na kojem se nalazi β -tubulin poznat kao (+) kraj.³¹



Slika 4. Grafički prikaz kristalne strukture α - i β -tubulina, heterodimera tubulina te protofilamenta koji nastaje njihovim slaganjem na odgovarajući način. Preuzeto i prilagođeno prema referenci 2.

Mikrotubuli su šuplje cilindrične strukture koje čine prethodno spomenuti protofilamenti, odnosno koje su sastavljene od heterodimera α -tubulina i β -tubulina raspoređenih od glave do repa mikrotubula. Najčešće je pojedini mikrotubul sastavljen od 13 paralelnih protofilamenata, koji tvore cjevastu strukturu vanjskog promjera od približno 25 nanometara.² Građa mikrotubula prikazana je na slici 5.



Slika 5. Grafički prikaz strukture mikrotubula. Preuzeto i prilagođeno prema referenci 2.

Zbog toga što se kod protofilamenata može razlikovati (+) i (-) kraj, isto se može kod mikrotubula. Minus kraj je tipično je povezan s centrima za organiziranje mikrotubula i služi kao mjesto za nukleaciju mikrotubula.³³

Uzdužnu polimerizaciju heterodimera tubulina pokreće hidroliza GTP-a vezanog za podjedinicu β -tubulina. Nakon polimerizacije, GTP se hidrolizira u GDP, što stabilizira rešetku

mikrotubula. Međutim, hidroliza GTP-a nije sinkronizirana među svim heterodimerima tubulina unutar mikrotubula, što dovodi do fenomena poznatog kao dinamička nestabilnost. Dinamička nestabilnost omogućuje mikrotubulima izmjenu između faza rasta (polimerizacija) i skraćivanja (depolimerizacija) kao odgovor na stanične signale. Lateralna interakcija između protofilamenata unutar mikrotubula uglavnom je posredovana nekovalentnim vezama koje uključuju specifične ostatke u α -tubulinu i β -tubulinu. Te interakcije doprinose stabilnosti i krutosti strukture mikrotubula.³³

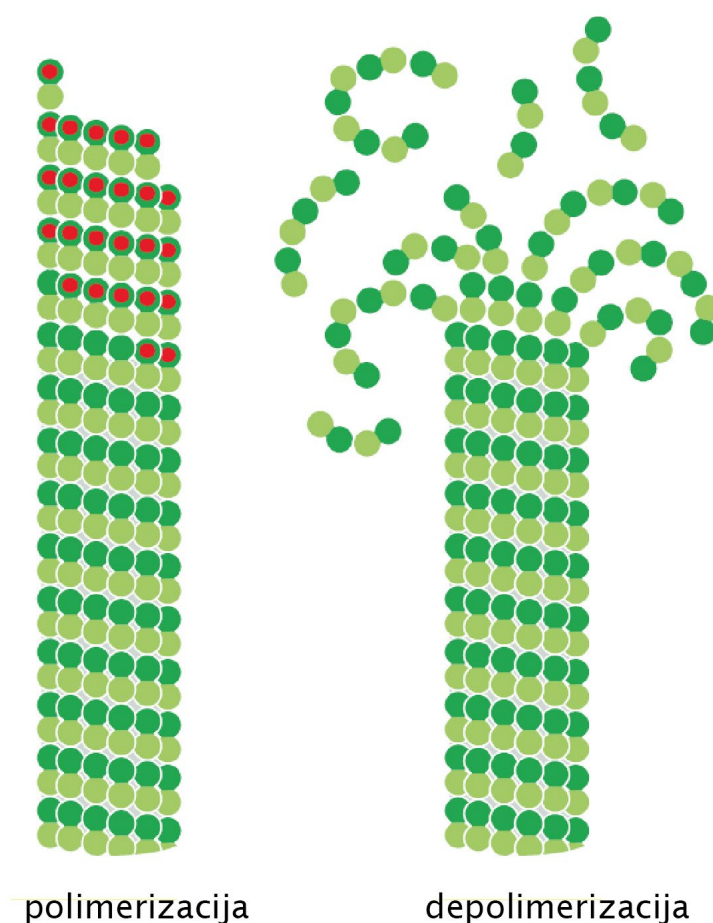
2.1.2. Dinamika mikrotubula

Dinamika mikrotubula odnosi se na kontinuiranu polimerizaciju i depolimerizaciju podjedinica tubulina na krajevima mikrotubula, što omogućuje njihovo brzo preoblikovanje i reorganizaciju unutar stanica. Dinamiku mikrotubula regulira nekoliko čimbenika, vezani nukleotid, povezane proteine i stanične signalne putove.⁵

Mikrotubuli su polarne strukture na kojima možemo razlikovati plus i minus kraj. Ovi krajevi pokazuju različita dinamička ponašanja. Plus krajevi prolaze kroz proces koji se naziva dinamička nestabilnost, karakteriziran fazama brze polimerizacije, odnosno rasta i nagle depolimerizacije, koja se u literaturi često naziva katastrofom. Ovo ponašanje omogućuje mikrotubulima da istražuju unutarstanični prostor, olakšavaju migraciju stanica i hvataju i transportiraju različite stanične komponente. Minus krajevi, s druge strane, pokazuju sporiju dinamiku i često su povezani s centrima za organiziranje mikrotubula (MTOC).³³

Na dinamiku mikrotubula prvenstveno utječe stanje podjedinica tubulina vezanih za nukleotide. Kada je vezan za GDP, heterodimer tubulina je u savijenoj konformaciji. Ta se konformacija slabo uklapa u ravnu stijenkiju mikrotubula kojeg formiraju. Izmjena GTP-a u njegovo aktivno mjesto izravnavala dimer, olakšavajući njegovu ugradnju na rastućem kraju mikrotubula što na kraju formira cjevasti zid mikrotubula. Dodatak dimera na kraju protofilamenta dovršava hidrolizni džep, pokrećući hidrolizu GTP-a u GDP. To omogućuje dimeru da se vrati u savijenu konformaciju. Rešetka, tj. stijenka mikrotubula ograničava dimer da ostane ravan pa tako ostaje zarobljen u napetom, visokoenergetskom stanju. Oslobođanje te energije napetosti zapravo je pokretačka sila depolimerizacije mikrotubula koji uglavnom sadrže tubulinski heterodimer vezan za GDP. Povoljna energija vezanja GTP-tubulina na rešetku pokreće polimerizaciju te je tubulin vezan za GTP tijekom formiranja mikrotubula. Podjedinice tubulina s vezanim GTP-om polimeriziraju na rešetku mikrotubula i pri tome stabiliziraju strukturu čak i ako se ona sastoji od GDP-tubulina. Međutim, tijekom vremena i

GTP koji je vezan za β -tubulin hidrolizira u GDP. Tubulin vezan za GDP je manje stabilan i skloniji depolimerizaciji, što dovodi do katastrofalnih događaja. Tubulin vezan za GTP također se može razmjenjivati s tubulinom vezanim za GDP u procesu poznatom kao spašavanje, koji omogućuje ponovno pokretanje rasta mikrotubula.^{34,35} Polimerizacija i depolimerizacija mikrotubula prikazane su na slici 6.



Slika 6. Grafički prikaz polimerizacije i depolimerizacije mikrotubula (crvena boja označava da je za te podjedinice vezan GTP). Preuzeto i prilagođeno prema referenci 2.

Osim stanja vezanog za nukleotide, dinamika mikrotubula regulirana je raznolikim nizom proteina. Mnogi proteini povezani s mikrotubulima (MAP) pomažu organizirati rast mikrotubula, posebice kod formiranja diobenog vretena što je objašnjeno kasnije u tekstu. U skladu s tim, može se razlikovati nekoliko klasa – proteini koji promiču i stabiliziraju polimerizaciju mikrotubula, proteini koji destabiliziraju mikrotubule, proteini koji funkcioniraju kao poveznica između različitih struktura i proteini s funkcijama povezanim s pokretljivošću.³⁶

Nemotorni MAP-ovi su nepomični proteini koji imaju doprinose nukleaciji i organizaciji mikrotubula, utječu na pokretljivost mikrotubula kao i na regulaciju kontrole staničnog ciklusa.³⁷ Suprotno tome, motorni proteini koriste kemijsku energiju oslobođenu hidrolizom adenozin trifosfata (ATP) kako bi izvršili aktivno usmjereno kretanje duž mikrotubula kroz interakciju s tubulinom. Postoje dvije osnovne klase motora mikrotubula – motori koji se kreću prema plus krajevima i motori koji se kreću prema minus krajevima mikrotubula. Motori koji se kreću prema plus kraju mikrotubula nazivaju se kinezini, dok su dineini obitelj motornih proteina koji se kreću prema minus kraju mikrotubula i nisu povezani s kinezinima.² Ti su motorni proteini izrazito važni za strukturu i funkciju diobenog vretena te će biti detaljnije opisani dalje u tekstu.

Jedan od ključnih proteina za dinamiku mikrotubula, čija je funkcija depolimerizacija mikrotubula je statmin. Taj protein regulira dinamiku mikrotubula tako da ili potiče depolimerizaciju ili prevenira polimerizaciju tubulinskih podjedinica. Depolimerizirajuća aktivnost stathmina u mikrotubulima se isključuje na početku mitoze fosforilacijom kako bi se omogućila polimerizacija mikrotubula i sastavljanje diobenog vretena. Fosforilirani stathmin mora se reaktivirati defosforilacijom prije nego što stanice izađu iz mitoze i uđu u interfazu. Ometanje funkcije stathmina prisilnom ekspresijom ili inhibicijom ekspresije rezultira smanjenom staničnom proliferacijom i nakupljanjem stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa. Prisilna ekspresija stathmina dovodi do abnormalnosti ili potpunog nedostatka sklapanja mitotičkog vretena i zaustavljanja stanica u ranim fazama mitoze. Iz toga proizlazi da stathmin, uz to što regulira stabilnost mikrotubula, također utječe na regulaciju mitoze, odnosno staničnog ciklusa u cjelini.³⁸

Proteini povezani s mikrotubulima (MAP) iz obitelji MAP2/Tau najpoznatiji su po svojoj aktivnosti stabilizacije mikrotubula. Najistraženiji su MAP2, MAP4 i Tau zbog toga što se radi o proteinima kralježnjaka, ali poznato je postojanje i njihovih homologa u drugim životinjama. MAP2 i Tau nalaze se u neuronima, dok je MAP4 prisutan u mnogim drugim tkivima, ali ga općenito nema u neuronima. Uz stabilizaciju mikrotubula, pretpostavlja se i da reguliraju mreže mikrotubula u aksonima i dendritima neurona. Noviji dokazi sugeriraju još širi raspon funkcija, kao što je vezanje na filamentozni aktin, regrutiranje signalnih proteina i regulacija transporta posredovanog mikrotubulima. Proučavanjem njihovih funkcija identificirane su različite kinaze niže u signalnom putu te brojni proteini koji reguliraju aktivnost stabilizacije mikrotubula

proteina obitelji MAP2/Tau što ponovno potvrđuje da se radi o kompleksnim procesima i signalnim putovima od kojih su u ovom radu izdvojeni samo neki čimbenici.³⁹

Uz navedeno, razni stanični signalni putovi također utječu na dinamiku mikrotubula. Na primjer, fosforilacija MAP-ova ili podjedinica tubulina može utjecati na stabilnost mikrotubula i regulirati interakcije s drugim staničnim komponentama. Dodatno, posttranslacijske modifikacije, poput acetilacije i detirozinacije podjedinica tubulina, mogu utjecati na dinamiku i funkcije mikrotubula.⁴⁰ Drugi značajni proteini vezani za mikrotubule detaljnije su objašnjeni dalje u tekstu nakon što je objašnjena struktura diobenog vretena.

2.2. Diobeno vreteno i dinamika mikrotubula

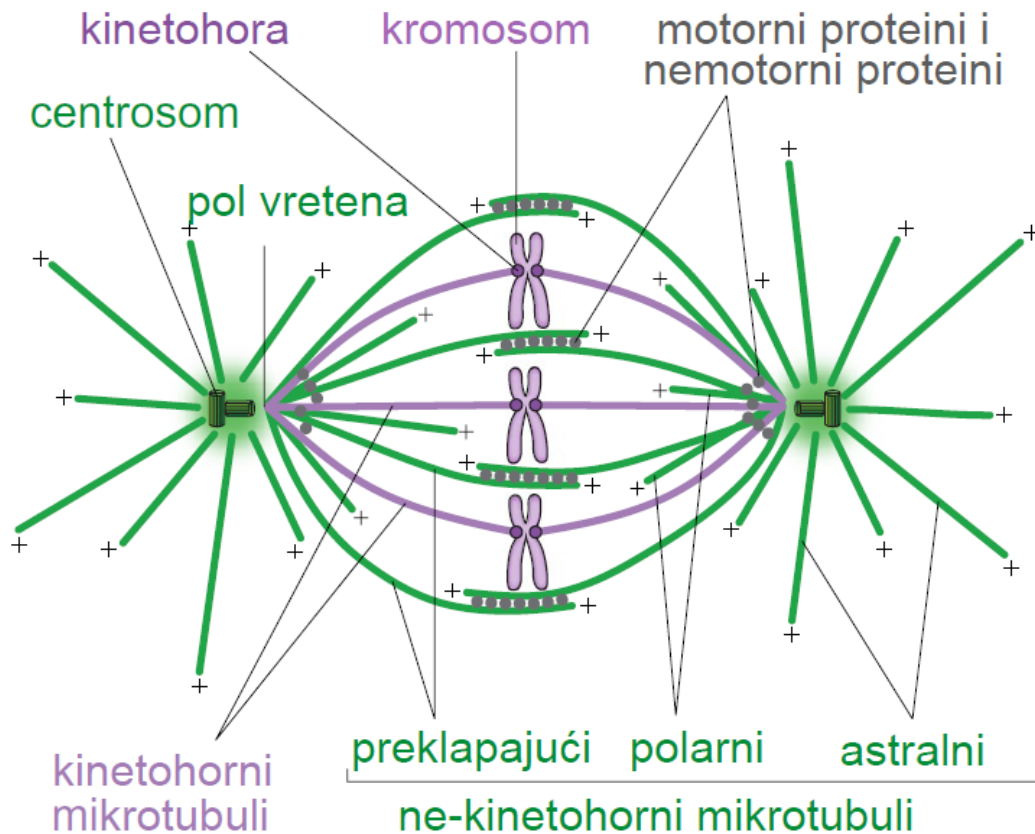
2.2.1. Struktura i organizacija diobenog vretena

Diobeno vreteno složena je i dinamična struktura odgovorna za točnu segregaciju kromosoma tijekom mitoze. Vreteno se formira se iz mikrotubula i neophodno je za osiguravanje vjerne distribucije genetskog materijala do stanica kćeri. Struktura i organizacija diobenog vretena ključni su za ispravno poravnavanje kromosoma, segregaciju kromosoma i diobu stanica.²

Diobeno vreteno bipolarna je struktura koja se sastoji od dvije glavne vrste mikrotubula: kinetohornih mikrotubula i ne-kinetohornih mikrotubula. Kinetohorni mikrotubuli izlaze iz polova vretena i pričvršćuju se za kinetohore, specijalizirane proteinske komplekse na centromerama kromosoma. Ne-kinetohorni mikrotubuli se ne pričvršćuju za kinetohore, a u ovu skupinu spadaju astralni, polarni i interpolarni mikrotubuli. Astralni mikrotubuli protežu se od polova vretena prema korteksu stanice i pomažu u postavljanju vretena unutar stanice. I polarni i interpolarni mikrotubuli prostiru se od jednog pola prema drugom i ne stupaju u interakciju s kinetohorama. Polarni mikrotubuli imaju slobodan (+) kraj, dok se interpolarni mikrotubuli preklapaju u središnjoj zoni vretena i međusobno interagiraju pa se zbog toga mogu nazivati i preklapajućim (eng. *overlap*) mikrotubulima. Prilikom međusobne interakcije interpolarnih mikrotubula dolazi do formiranja antiparalelnog preklopa.⁴¹ Shema diobenog vretena i njegovih dijelova prikazana je na slici 7.

Tijekom mitoze, glavna uloga diobenog vretena je stvaranje sila koje poravnavaju kromosome u ekvatorijalnoj ravnini i kasnije ih razdvajaju prema suprotnim polovima vretena. Smatra se da sile koje djeluju na kinetohore uglavnom stvaraju kinetohorni mikrotubuli koji s njima stupaju u interakciju. S druge strane, interpolarni mikrotubuli ne stupaju u interakciju s

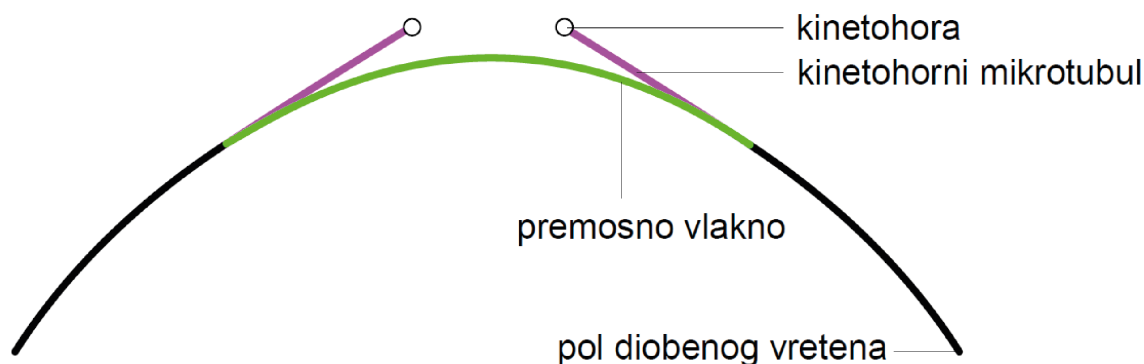
kinetohorama i njihove interakcije s k-vlaknima su slabe i postoje samo u blizini polova vretena.⁴²



Slika 7. Grafički prikaz diobenog vretena i osnovnih dijelova koji čine diobeno vreteno. Preuzeto i prilagođeno prema referenci 41.

Prema klasičnom pogledu na diobeno vreteno, izvorište gotovo svih sila u diobenom vretenu trebali bi biti kinetohorni mikrotubuli. Prema tom tumačenju, očekivalo bi se da se kinetohorni mikrotubuli prostiru pravocrtno od centrosoma prema kinetohorama.⁴² Međutim, kod raznih vrsta kinetohorni mikrotubuli su zaobljeni, a ne ravni.⁴³ Nedavne studije pokazale su da snop preklapajućih mikrotubula, nazvan premosnim vlaknima, uravnotežuje napetost između sestrinskih kinetohora i podržava zaobljeni oblik vretena.⁴⁴ Značajno je da su premosna vlakna formirana od antiparalelnih mikrotubula što sugerira da su premosna vlakna podskupina interpolarnih mikrotubula. Korištenjem eksperimenata laserskog rezanja, pokazalo se da ti mikrotubuli premošćuju područje između sestrinskih kinetohora. Međusobno povezuju

kinetohorne mikrotubule s oba pola koji su povezani s nekim parom sestrinskih kinetohora u jedan mehanički objekt (slika 8) koji može izdržati fizičke poremećaje.⁴⁴



Slika 8. Grafički prikaz prenosnog vlakna. Preuzeto i prilagođeno prema referenci 41.

Polovi vretena služe kao organizacijski centri za nukleaciju mikrotubula (MTOCs) i bitni su za formiranje vretena. Centrosom, zapravo glavno središte za organiziranje mikrotubula u životinjskoj stanici, sastoji se od dva ortogonalna centriola okružena amorfnom masom, koja sadrži proteine odgovorne za nukleaciju mikrotubula. Nakon duplikacije u interfazi, centrosomi s izlaznim mikrotubulima počinju okupljati bipolarno vreteno na početku mitoze. Iako se put sastavljanja vretena razlikuje među vrstama stanica, sva vretena dijele zajedničke strukturne značajke.⁴⁵ Polovi vretena sadrže proteinski kompleks nazvan kompleks γ -tubulinskog prstena (γ -TuRC, eng. *γ -tubulin ring complex*), koji služi kao obrazac za nukleaciju mikrotubula. γ -TuRC regrutira i aktivira γ -tubulin, koji zauzvrat inicira polimerizaciju mikrotubula.⁴⁶ Polovi vretena također sadrže druge proteine, kao što su centrosomin i pericentrin, koji doprinose organizaciji i stabilnosti vretena. Organizaciju diobenog vretena reguliraju različiti čimbenici, uključujući već spomenute proteine povezane s mikrotubulima (MAP-ove).⁴³

2.2.2. Proteini diobenog vretena

Prethodno opisani proteini povezani s mikrotubulima, motorni i nemotorni, pomažu u organizaciji diobenog vretena i omogućuju mu pravilno funkcioniranje. Neki od najvažnijih proteina za dinamiku mikrotubula u diobenom vretenu su: dinein, kinezin-1, kinezin-5, kinezin-4, kinezin-13, kinezin-8 i protein regulator citokineze 1 (PCR1, eng. *protein regulator of cytokinesis 1*).²

Kao što je već spomenuto, motori koji se kreću prema minus kraju mikrotubula, tj. na polovima vretena nazivaju se dineinima. Dinein je veliki motorni proteinski kompleks

sastavljen od više podjedinica. Dvije glavne klase dineina su citoplazmatski dinein i aksonemski dinein. Citoplazmatski dinein je uključen u unutarstanični transport, dok aksonemalni dinein djeluje na pokretljivost trepetljika i flagela. Obje se klase sastoje od teških lanaca, međulanaca, lakih međulanaca i lakih lanaca, tvoreći kompleks s više podjedinica koji pokreće kretanje dineina duž mikrotubula. Najobilniji oblik citoplazmatskog dineina je citoplazmatski dinein-1 (u daljnjem tekstu dinein) koji pokreće kretanje prema minus krajevima mikrotubula.^{47,48} Dineini su prvenstveno odgovorni za retrogradni transport, pomicanje tereta prema tijelu stanice u eukariotskim stanicama. Oni prenose različite terete, uključujući membranske organele, endosome, lizosome i čestice koje sadrže mRNA. U neuronima, citoplazmatski dinein je ključan za retrogradni transport signalnih endosoma i drugih bitnih komponenti od aksonskih završetaka do tijela stanice.⁴⁹ U mitozu, dinein je uključen u kretanje kromosoma prema polovima, organizaciju vretena, pozicioniranje vretena i utišavanje SAC-a (kontrolne točke). Antiparalelne regije interpolarnih mikrotubula sadrže motorne proteine koji mogu doprinijeti klizanju antiparalelnih mikrotubula. Nedavna *in vitro* istraživanja otkrila su da dinein, osim umrežavanja i vezivanja mikrotubula, doprinosi klizanju antiparalelnih mikrotubula.⁵⁰ Aktivnost dyneina je strogo regulirana kako bi se kontrolirao transport tereta i osigurale pravilne stanične funkcije. Regulacijski mehanizmi uključuju posttranslacijske modifikacije, interakcije s pomoćnim proteinima i koordinaciju s drugim motornim proteinima. Proteini povezani s dineinom, poput dinaktina, bitni su za modulaciju funkcije dineina i reguliranje njegovo kretanje duž mikrotubula.⁵¹ Pokazano je da dinein i kinezin-5 generiraju suprotne sile na antiparalelne mikrotubule tijekom bipolarizacije vretena te se smatra ta je kombinacija ovih sila izrazito bitna za formiranje bipolarnog vretena.⁵²

Kinezin-1, također poznat kao konvencionalni kinezin ili teški lanac kinezina (KIF5), dobro je proučen član nadobitelji kinezina motornih proteina. Kinezin-1 prvi je put identificiran ranih 1980-ih kao motorni protein baziran na mikrotubulima odgovoran za anterogradni transport u aksonima i drugim staničnim procesima. Kinezin-1 motorni je protein koji se sastoji od više podjedinica: od dva teška lanca i dva laka lanca. Svaki teški lanac sastoji se od različitih domena sa specifičnim funkcijama. N-terminalna globularna motorna domena zaslužna je za aktivnost ATPaze, ključnu za hidrolizu ATP-a i stvaranje sile potrebne za kretanje duž mikrotubula. Domena na C-kraju veže se za lake lance i adaptere tereta, omogućujući kinezinu-1 transport širokog spektra staničnih tereta. Kinezin-1 primarno funkcionira u anterogradnom transportu, pomičući teret iz tijela stanice prema aksonskim ili dendritskim vrhovima u neuronima. Ima

ključnu ulogu u isporuci membranskih organela, vezikula i drugih staničnih komponenti potrebnih za rast stanica, formiranje sinapsi i neurotransmisiju u neuronima.⁵³ Osim toga, kinezin-1 je uključen u razne druge stanične procese izvan neuronskog transporta. Uključen je u transport vezikula, mitohondrija, endosoma i lizosoma izvedenih iz Golgijevog sustava, pridonoseći staničnoj homeostazi i distribuciji bitnih staničnih komponenti. Također je uočeno da kinezin-1 sudjeluje u sklapanju mitotskog vretena, poravnanju kromosoma i citokinezi tijekom stanične diobe. Aktivnost kinezina-1 je strogo regulirana kako bi se osigurala precizna kontrola nad prijevozom tereta. Regulacijski mehanizmi uključuju posttranslacijske modifikacije, interakcije s proteinima povezanim s kinezinom i modulaciju hidrolize ATP-a.⁵⁴

U većini eukariotskih stanica, smatra se da kinezin-5 ima veliku važnost u relativnom klizanju i sortiranju mikrotubula mitotskog vretena.⁵⁵ Kinezin-5, kao i skoro svi kinezini, motorni je protein usmjeren prema (+) kraju mikrotubula. Pokazano je kako može razdvojiti antiparalelne mikrotubule i umrežiti paralelne bez njihovog međusobnog klizanja. Također, pokazano je da sile koje stvara kinezin-5 skaliraju ovisno o duljini preklapanja mikrotubula, kako sile guranja tako i sile kočenja.⁵⁵ Eg5, jedan od prvih poznatih mitotičkih motornih proteina, član je obitelji kinezin-5. Kinesin-5 motori ključni su za generiranje sila za odvajanje polova vretena i formiranje bipolarnog mitotičkog vretena.⁵⁶

Jedan od kinezina koji je najznačajniji u središnjoj zoni vretena sigurno je član obitelji kinezin-4 – Kif4A. Ovaj kinezin bio je prvi kinezin za koji je uočeno da se povezuje s mitotskim kromosomima, pa je stoga nazvan kromokinezin.⁵⁷ Kao i ostali kinezini, Kif4A se kreće prema plus krajevima mikrotubula, ali nakon agregacije na plus kraju, Kif4A smanjuje polimerizaciju i depolimerizaciju mikrotubula.⁵⁸ Na početku anafaze, Kif4A je također lokaliziran u središnjem dijelu vretena te se smatra da je osobito važan za regulaciju formiranja tog dijela diobenog vretena.⁵⁷

Za razliku od drugih kinezina, obitelj kinezina-13 jedinstvena je skupina motoričkih proteina koji nisu pokretni, tj. obitelj kinezina-13 ne koristi energiju hidrolize ATP-a za kretanje u smjeru duž mikrotubula. Kada se vežu i za (+) i (-) kraj mikrotubula, članovi obitelji kinezin-13 potiču destabilizaciju mikrotubula depolimerizacijom podjedinica. Porodica kinezina-13 ima jednu od integralnih uloga u regulaciji dinamike mikrotubula. Opsežno proučavan član obitelji je kinezin povezan s mitotičkim centromerom (MCAK). Mehanizam kako kinezini-13 depolimeriziraju mikrotubule još nije u potpunosti razjašnjen, ali poznato je da uz reakciju

hidrolize ATP-a dolazi do katalitičke depolimerizacije mikrotubula pri čemu se ubrzava disocijacija tubulina s oba kraja mikrotubula.^{59,60}

Motorni proteini igraju važnu ulogu u formiranju mitotskog vretena, kontroliranjem stabilnosti pojedinačnih mikrotubula ili umrežavanjem i razdvajanjem susjednih mikrotubula. Motori iz obitelji kinezin-8 glavni su regulatori koji kontroliraju dinamiku mikrotubula, koji mogu koristiti aktivnosti koje dovode do skupljanja kromosoma. Jedan od motora kinezina-8, Kif18A, translocira se u smjeru duž mikrotubula i depolimerizira stabilne plus-krajeve mikrotubula.⁶¹ Za razliku od drugih kinezina, istraživanja pokazuju da kinezin-8 ima dvostruku funkciju, i pokretnu i depolimerizirajuću ulogu.⁶²

Proteinski regulator citokineze 1 (PRC1) visoko je očuvani MAP, nemotorni koji djeluje tako da pasivno poprečno povezuje antiparalelne mikrotubule.⁶³ Pokazano je kako je lokaliziran na antiparalelnim mikrotubulima središnje zone vretena. Njegov afinitet za vezanje na mikrotubule reguliran je događajima fosforilacije i defosforilacije. Kada se fosforilira, PRC1 se može vezati za mikrotubule, ali ih ne može unakrsno povezati. Nakon defosforilacije, PRC1 spaja susjedne mikrotubule i stabilizira prethodno formirana antiparalelna preklapanja.⁶⁴

2.2.3. *Mehanizmi kretanja kromosoma*

Za kretanje i pozicioniranje kromosoma unutar vretena potrebno je stvaranje sila i koordinirano djelovanje različitih molekularnih mehanizama. Mehanizmi stvaranja sila i kretanja kromosoma uključuju koordinirano djelovanje motornih proteina, mikrotubula i proteina povezanih s kromosomima. Ovi mehanizmi osiguravaju ispravno pričvršćivanje, poravnanje i kretanje kromosoma unutar diobenog vretena, pridonoseći točnoj segregaciji kromosoma.^{43,65}

Brojni mehanizmi kretanja i pozicioniranja kromosoma povezani su s prethodno opisanim proteinima vezanim za mikrotubule, i motornim i ne-motornim. Proteini povezani s kromosomima, kao što su proteini kinetohore, također su važni u stvaranju sila i kretanju kromosoma tijekom formiranja vretena. Kompleks Ndc80, ključna komponenta kinetohora, stupa u interakciju s mikrotubulima i potiče njihovo vezivanje za kinetohoru. Kompleks se sastoji od četiri podjedinice: Ndc80, Nuf2, Spc24 i Spc25. Ndc80 služi kao središnja komponenta i izravno komunicira s mikrotubulima, dok ostale podjedinice stabiliziraju kompleks i reguliraju njegovu funkciju. Kompleks Ndc80 tvori duge, fleksibilne štapiće koji se protežu od kinetohora i vežu se za mikrotubule, olakšavajući pričvršćivanje i kretanje kromosoma. Također doprinosi stvaranju sila za kretanje kromosoma. Kompleks Ndc80 djeluje

kao molekularna spojka koja pretvara sile depolimerizacije mikrotubula u usmjereno gibanje, omogućujući kromosomima da se kreću prema polovima.²¹

Mehanizmi za hvatanje i kongresiju kromosoma osiguravaju pravilno poravnanje kromosoma unutar vretena. Proces hvatanja uključuje početno pričvršćivanje mikrotubula na kinetohore, dok se kongresija odnosi na kretanje kromosoma prema metafaznoj ploči. Točan način formiranja mikrotubula u prometafazi i njihovog povezivanja s kinetohorima još uvijek se pitanje brojnih znanstvenih rasprava, ali najbolje je istražen mehanizam „search-and-capture“. Prema tom mehanizmu, mikrotubuli nukleiraju iz pola vretena prema središtu i kada dođe do interakcije između kinetohore i mikrotubula, dolazi do stabilizacije i daljnjeg pričvršćivanja. Ovaj proces osigurava da je svaki kromosom uhvaćen i ispravno poravnat.⁶⁶

Polarne sile izbačaja doprinose kretanju i poravnavanju kromosoma tijekom formiranja vretena. Te sile djeluju na kromosome, gurajući ih od polova vretena prema metafaznoj ploči. Smatra se da dinamika mikrotubula, poput polimerizacije i depolimerizacije, u središnjoj zoni vretena stvara te sile. Polarne sile izbačaja posredovane su motornim proteinima i dinamikom mikrotubula. Dineinski i kinezinski motori, zajedno s dinamikom mikrotubula, doprinose uspostavi i održavanju tih sila. Koordinirano djelovanje tih sila pomaže pravilnom pozicioniranju kromosoma unutar vretena.⁴³

2.3. Zaključak

Proučavanje dinamike mikrotubula pruža dragocjene uvide u kompleksnu i dinamičnu prirodu ovih citoskeletnih struktura. Kroz razumijevanje sklapanja, nestabilnosti i regulacije mikrotubula, očita postaje njihova ključnu uloga u staničnim procesima. Cilj ovog rada bio je sažeti ključne spoznaje vezane uz dinamiku formiranja mikrotubula.

Za razumijevanja funkcije mikrotubula, nužno je poznavanje staničnog ciklusa i strukture stanica. Mikrotubuli su sastavni dio citoskeleta i važni su za brojne događaje u staničnom ciklusu, prvenstveno u procesima stanične diobe i mitoze. Oni su odgovorni za formiranje diobenog vretena, točnu segregaciju kromosoma, aktivaciju kontrolne točke vretena, citokinezu i održavanje oblika stanica. Dinamička priroda i regulacija mikrotubula ključni su za osiguravanje vjernosti stanične diobe i pravilne distribucije genetskog materijala stanicama kćerima. U procesu sastavljanja mikrotubula najvažnija je uloga heterodimera α - i β -tubulina koji polimerizira i tako tvori šuplju cilindričnu strukturu mikrotubula. Energetski povoljno sklapanje mikrotubula je olakšano hidrolizom GTP-a u GDP, što utječe na stabilnost i rast

mikrotubula. Dinamička nestabilnost mikrotubula uključuje faze brzog rasta ili polimerizacije, praćene naglim skraćivanjem ili depolimerizacijom. Prijelaz iz faze rasta u fazu smanjivanja, poznat kao katastrofa, pod utjecajem je brojnih čimbenika, nukleotida vezanih za podjedinicu tubulina, proteina povezanih s mikrotubulima (MAP) i staničnog signalnog puta. Dinamička nestabilnost mikrotubula omogućuje im organizaciju u unutarstaničnom prostoru prema potrebama stanice i sudjelovanje u unutarstaničnom transportu. Proteini povezani s mikrotubulima glavni su regulatori dinamike mikrotubula. MAP-ovi mogu modulirati stabilnost mikrotubula, poticati ili inhibirati rast, regulirati katastrofe i događaje spašavanja te posredovati u interakcijama s drugim staničnim komponentama. Različite funkcije MAP-ova naglašavaju njihovu važnost u orkestriranju dinamike mikrotubula i staničnih procesa.

Razumijevanje dinamike mikrotubula ima široke implikacije u raznim područjima biokemije, biologije i drugih srodnih znanosti. U neurobiologiji, dinamika mikrotubula ključna je za razvoj neurona, unutarstanični transport i sinaptičku plastičnost. Greške u regulaciji dinamike mikrotubula povezane su s neurodegenerativnim poremećajima, što naglašava važnost daljnjih istraživanja u ovom području. U biologiji raka, potencijalne greške u dinamici mikrotubula mogu poremetiti diobu stanica i pospješiti progresiju tumora. Zbog toga kontinuirano istraživanje dinamike mikrotubula ima veliki potencijal u otkrivanju temeljnih mehanizama pojedinih bolesti, kao i u identificiranju novih terapijskih ciljeva i razvoj intervencija za iste.

Proučavanje dinamike mikrotubula polako omogućava nam daljnje otkrivanje mehanizama koji leže u osnovi njihovog sastavljanja, nestabilnosti i regulacije. Dinamika formiranja mikrotubula predstavlja zamršen sustav koji je u osnovi temeljnih staničnih procesa. Razjašnjavanjem mehanizama koji upravljaju sastavljanjem, nestabilnošću i regulacijom mikrotubula, stječemo dublje razumijevanje stanica i procesa koji se u njima konstantno odvijaju kako bi mogle funkcionirati.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. A. Fletcher, R. D. Mullins, *Nature* **463** (2010) 485–492.
2. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell, 6th ed.*, Garland Science, New York, 2014.
3. A. Desai, T. J. Mitchison, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **13** (1997) 83–117.
4. E. Nogales, *Annu. Rev. Biochem.* **69** (2000) 277–302.
5. A. Akhmanova, M. O. Steinmetz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16** (2015) 711–726.
6. G. Goshima, J. M. Scholey, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **26** (2010) 21–57.
7. S. Dumont, T. J. Mitchison, *Curr. Biol.* **19** (2009) R749–R761.
8. K. Chabin-Brion, J. Me Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Ve Durand, C. Poü, *Mol. Biol. Cell* **12** (2001) 2047–2060.
9. M.-Y. Tsai, S. Wang, J. M. Heidinger, D. K. Shumaker, S. A. Adam, R. D. Goldman, Y. Zheng, *Science (1979)* **311** (2006) 1887–1893.
10. J. Lüders, T. Stearns, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (2007) 161–167.
11. M. Delgado, T. C. Chambers, *Cell Cycle* **17** (2018) 1784–1796.
12. E. Kitamura, K. Tanaka, Y. Kitamura, T. U. Tanaka, *Genes Dev.* **21** (2007) 3319–3330.
13. G. Laflamme, S. Sim, A. Leary, M. Pascariu, J. Vogel, D. D’Amours, *Cell Rep.* **26** (2019) 2875–2889.e3.
14. O. Gavet, J. Pines, *Dev. Cell* **18** (2010) 533–543.
15. D. Fisher, L. Krasinska, D. Coudreuse, B. Novák, *J. Cell Sci.* **125** (2012) 4703–4711.
16. P. Nurse, *Nature* **344** (2000) 503–508.
17. Y. Zhai, P. J. Kronebusch, P. M. Simon, G. G. Borisy, *J. Cell Biol.* **135** (1996) 201–214.
18. S. Gadde, R. Heald, *Curr. Biol.* **14** (2004) R797–R805.
19. R. Heald, A. Khodjakov, *J. Cell Biol.* **211** (2015) 1103–1111.
20. R. B. Nicklas, *Science (1979)* **275** (1995) 632–637.
21. I. M. Cheeseman, A. Desai, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2008) 33–46.
22. A. Musacchio, E. D. Salmon, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (2007) 379–393.
23. H. Maiato, E. Logarinho, *Nat. Cell Biol.* **16** (2014) 386–394.

24. G. J. P. L. Kops, B. A. A. Weaver, D. W. Cleveland, *Nat. Rev. Cancer* **5** (2005) 773–785.
25. J. M. Peters, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7** (2006) 644–656.
26. J. Pines, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12** (2011) 427–438.
27. K. Vukušić, I. M. Tolić, *Semin. Cell Dev. Biol.* **117** (2021) 127–139.
28. J. P. Fededa, D. W. Gerlich, *Nat. Cell Biol.* **14** (2012) 440–447.
29. E. Bi, H. O. Park, *Genetics* **191** (2012) 347–387.
30. F. A. Barr, U. Gruneberg, *Cell* **131** (2007) 847–860.
31. E. Nogales, S. G. Wolf, K. H. Downing, *Nature* **391** (1998) 199–203.
32. C. P. H. Yang, S. B. Horwitz, *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017).
33. J. Howard, A. A. Hyman, *Nature* **422** (2003) 753–758.
34. J. Howard, A. A. Hyman, *Curr. Opin. Cell Biol.* **19** (2007) 31–35.
35. M. Dogterom, J. W. J. Kerssemakers, G. Romet-Lemonne, M. E. Janson, *Curr. Opin. Cell Biol.* **17** (2005) 67–74.
36. H. Maiato, C. L. Rieder, A. Khodjakov, *J. Cell Biol.* **167** (2004) 831–840.
37. A. L. Manning, D. A. Compton, *Curr. Opin. Cell Biol.* **20** (2008) 101–106.
38. C. I. Rubin, G. F. Atweh, *J. Cell. Biochem.* **93** (2004) 242–250.
39. L. Dehmelt, S. Halpain, *Genome Biol* **6** (2004).
40. A. Ramkumar, B. Y. Jong, K. M. Ori-McKenney, *Dev. Dyn.* **247** (2018) 138–155.
41. I. M. Tolić, *Eur. Biophys.* **47** (2018) 191–203.
42. J. Simunić, I. M. Tolić, *Trends Biochem. Sci.* **41** (2016) 824–833.
43. N. Pavin, I. M. Tolić, *Annu. Rev. Biophys.* **45** (2016) 279–298.
44. J. Kajtez, A. Solomatina, M. Novak, B. Polak, K. Vukušić, J. Rüdiger, G. Cojoc, A. Milas, I. Šumanovac Šestak, P. Risteski, F. Tavano, A. H. Klemm, E. Roscioli, J. Welburn, D. Cimini, M. Glunčić, N. Pavin, I. M. Tolić, *Nat. Commun.* **7** (2016).
45. J. C. Waters, E. D. Salmon, *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** (1997) 37–43.
46. C. Wiese, Y. Zheng, *Nat. Cell Biol.* **2** (2000) 358–364.
47. V. J. Allan, *Biochem. Soc. Trans.* **39** (2011) 1169–1178.
48. S. L. Reck-Peterson, W. B. Redwine, R. D. Vale, A. P. Carter, *Nat Rev Mol Cell Biol* **19** (2018) 382–398.
49. R. B. Vallee, J. C. Williams, D. Varma, L. E. Barnhart, *J Neurobiol* **58** (2004) 189–200.
50. M. E. Tanenbaum, R. D. Vale, R. J. McKenney, *Elife* **2013** (2013).

51. T. A. Schroer, *Annu Rev Cell Dev Biol* **20** (2004) 759–779.
52. T. J. Mitchison, P. Maddox, J. Gaetz, A. Groen, M. Shirasu, A. Desai, E. D. Salmon, T. M. Kapoor, *Mol. Biol. Cell* **16** (2005) 3064–3076.
53. S. A. Endow, F. J. Kull, H. Liu, *J Cell Sci* **123** (2010) 3420.
54. K. J. Verhey, J. W. Hammond, *Nat Rev Mol Cell Biol* **10** (2009) 765–777.
55. T. M. Kapoor, *Biology (Basel)* **6** (2017).
56. K. E. Sawin, K. LeGuellec, M. Philippe, T. J. Mitchison, *Nature* **359** (1992) 540–543.
57. S.-Z. Wang, R. Adler, *J. Cell Biol.* **128** (1995) 761–768.
58. H. Bringmann, G. Skiniotis, A. Spilker, S. Kandels-Lewis, I. Vernos, T. Surrey, A Kinesin-like Motor Inhibits Microtubule Dynamic Instability, 2000.
59. J. Helenius, G. Brouhard, Y. Kalaidzidis, S. Diez, J. Howard, *Nature* **441** (2006) 115–119.
60. A. W. Hunter, M. Caplow, D. L. Coy, W. O. Hancock, S. Diez, L. Wordeman, J. Howard, *Mol. Cell* **11** (2003) 445–457.
61. C. Zhu, J. Zhao, M. Bibikova, J. D. Levenson, E. Bossy-Wetzels, J. B. Fan, R. T. Abraham, W. Jiang, *Mol. Biol. Cell* **16** (2005) 3187–3199.
62. M. L. Gupta, P. Carvalho, D. M. Roof, D. Pellman, *Nat. Cell Biol.* **8** (2006) 913–923.
63. P. Bieling, I. A. Telley, T. Surrey, *Cell* **142** (2010) 420–432.
64. C. Mollinari, J. P. Kleman, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, R. L. Margolis, *J. Cell Biol.* **157** (2002) 1175–1186.
65. K. Vukušić, R. Buđa, I. M. Tolić, *J. Cell Sci.* **132** (2019).
66. N. Pavin, I. M. Tolić-Nørrelykke, *Syst. Synth. Biol.* **8** (2014) 179–186.